

**Deteksi**  
***infectious hypodermal and haematopoietic necrosis***  
***virus (IHHNV) - Bagian 2:***  
***Metode single step polymerase chain reaction (PCR)***





© BSN 2016

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN  
Email: [dokinfo@bsn.go.id](mailto:dokinfo@bsn.go.id)  
[www.bsn.go.id](http://www.bsn.go.id)

Diterbitkan di Jakarta



## Daftar Isi

|   |     |
|---|-----|
| Prakata .....   | ii  |
| Pendahuluan.....  | iii |
| 1. Ruang Lingkup .....  | 1   |
| 2. Acuan Normatif.....  | 1   |
| 3. Istilah dan definisi .....   | 1   |
| 4. Prinsip umum.....  | 2   |
| 5. Peralatan .....  | 2   |
| 6. Bahan .....  | 3   |
| 7. Prosedur .....   | 3   |
| 8. Jaminan mutu .....   | 6   |
| Tabel 1 - Contoh uji berdasarkan stadia udang.....                        | 3   |
| Tabel 2 – Komposisi koktail PCR .....                                     | 5   |
| Tabel 3 – Program amplifikasi .....                                       | 5   |
| Gambar 1 – Hasil deteksi IHHNV dengan metode <i>single step</i> PCR ..... | 6   |
| Lampiran A (Normatif)_Hasil alignment sekuen DNA IHHNV .....              | 7   |
| Lampiran B (Informatif)_Prosedur ekstraksi .....                          | 8   |
| Lampiran C (Informatif)_Pembuatan larutan dan media.....                  | 9   |
| Bibliografi .....   | 10  |



## Prakata

Standar deteksi *infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus* (IHHNV) - Bagian 2: Metode *single step polymerase chain reaction* (PCR) ini menetapkan metode uji untuk mendeteksi *infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus* (IHHNV), sebagai upaya pencegahan penyebaran penyakit hama dan penyakit ikan/hama penyakit ikan karantina (HPI/HPIK)

Standar ini merupakan revisi dari 7305:2009 tentang Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk identifikasi *white spot syndrome virus* (WSSV) dan *infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus* (IHHNV). Perubahan pada standar ini dibandingkan dengan SNI sebelumnya meliputi ruang lingkup, acuan normatif dan prosedur. Perubahan didasarkan pada perubahan Manual of diagnostic tests for aquatic animals.oleh Office Internationale Epizooticae (OIE) yang dijadikan sebagai referensi acuan

Standar ini merupakan rangkaian dari standar seri deteksi Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) yang memberikan beberapa alternatif metode uji sesuai dengan tingkat teknologi pada masing-masing laboratorium uji.

Standar ini dirumuskan oleh Komite Teknis 65-07 Perikanan Budidaya dan telah pada konsensus pada tanggal 5 Agustus 2015 di Tangerang Selatan, yang dihadiri oleh anggota Komite Teknis 65-07, wakil-wakil dari pemerintah, produsen, konsumen, lembaga penelitian/pakar dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui jajak pendapat pada tanggal 30 September 2015 sampai dengan 29 November 2015 dengan hasil akhir disetujui menjadi RASNI.



## Pendahuluan

Peraturan yang dijadikan rujukan di dalam penyusunan standar ini adalah :

1. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No 28 tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu dan Gizi Pangan;
2. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. PER.19/Men/2010 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Pangan;
3. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan;
4. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke wilayah Republik Indonesia;
5. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa;
6. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. 26/Kepmen-KP/2013 tentang Penetapan Jenis-Jenis Hama dan Penyakit Ikan Karantina (HPIK), Golongan, Media Pembawa dan Penyebarannya.





**Deteksi *infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus* (IHHNV) -  
Bagian 2: Metode *single step polymerase chain reaction* (PCR)**

**1. Ruang Lingkup**

Standar ini menetapkan deteksi *infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus* (IHHNV) dengan menggunakan metode *single step polymerase chain reaction* (PCR).

**2. Acuan Normatif**

SNI 7306, *Pengambilan dan pengiriman contoh air dan ikan untuk pemeriksaan penyakit.*

**3. Istilah dan definisi**

Untuk tujuan penggunaan dokumen ini, istilah dan definisi berikut digunakan

**3.1**

**amplifikasi**

pelipatgandaan bagian tertentu dari *deoxyribo nucleic acid* (DNA) virus dengan bantuan reaksi enzim *polymerase*

**3.2**

***annealing***

proses penempelan primer pada DNA untai tunggal yang komplementer

**3.3**

**denaturasi**

pemisahan DNA untai ganda menjadi untai tunggal

**3.4**

**DNA**

materi genetik yang tersusun atas nukleotida dengan gula deoksiribosa, gugus fosfat, dan basa nitrogen (guanin, adenin, sitosin, timin)

**3.5**

**ekstensi**

proses pemanjangan primer dengan bantuan enzim *DNA polymerase*, sehingga akan terbentuk DNA untai ganda

**3.6**

**ekstraksi**

proses pemisahan materi genetik dari jaringan atau sel

**3.7**

**elektroforesis**

proses pemisahan DNA hasil amplifikasi berdasarkan pada berat molekul

**3.8**

***infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus* (IHHNV)**

virus yang termasuk dalam genus *Brevidensovirus*, famili *Parvoviridae*, mempunyai materi genetik DNA untai tunggal dan tidak beramplop



**3.9****mastermix**

campuran yang terdiri dari DNA polymerase, primer, dNTPs, *buffer* dan DDW

**3.10****koktail**

*mastermix* ditambah DNA *template*

**3.11****polymerase chain reaction (PCR)**

suatu metode *in vitro* yang digunakan untuk menyintesis sekuen DNA tertentu dengan menggunakan primer oligonukleotida yang menempel pada sekuen komplementernya

**3.12****pooling contoh uji**

gabungan beberapa contoh uji yang berasal dari satu lokasi pengambilan

**3.13****supernatan**

cairan hasil sentrifugasi

**3.14****template**

DNA hasil ekstraksi yang digunakan sebagai cetakan untuk proses amplifikasi

**4. Prinsip umum**

Mengisolasi dan memurnikan DNA dari contoh uji yang diduga terinfeksi IHHNV untuk dideteksi dengan metoda *single step* PCR.

**5. Peralatan**

- a) alat pengukur konsentrasi DNA berbasis spektrofotometri UV;
- b) autoklaf;
- c) elektroforesis;
- d) *freezer* (-20 °C);
- e) *heating block/waterbath*;
- f) kamera/peralatan dokumentasi;
- g) *laminar air flow*;
- h) mikropipet berbagai ukuran 0,1 µl – 1000 µl;
- i) *minimixer*;
- j) mini sentrifus;
- k) *pellet pestle*/penggerus jaringan;
- l) peralatan bedah, terdiri dari; pinset, gunting, dan pisau bedah;
- m) *rack ice block*;
- n) sentrifus;
- o) *thermal cycler*;
- p) timbangan analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- q) transiluminator UV.



## 6. Bahan

- a) agarosa;
- b) akuades;
- c) etanol 96% (p.a);
- d) etanol 75% (p.a);
- e) GelRed™ 10 000x *in water* (pewarna DNA);
- f) kit ekstraksi DNA dengan metode *spin column*;
- g) formula PCR:
  - 5x PCR *buffer*,
  - MgCl<sub>2</sub> (25 mM),
  - dNTP mix (10 mM),
  - *Taq* DNA polymerase (5 U/μl)
- h) mikrotip berbagai ukuran antara 10 μl – 1000 μl;
- i) *nuclease-free water/double distilled water* (DDW);
- j) masker;
- k) 0,5x TBE *buffer* (*tris boric* EDTA; 45 mM *tris boric* dan 1 mM EDTA);
- l) 6x *loading dye* mengandung pewarna *bromophenol blue*;
- m) sarung tangan (*powder-free*);
- n) tabung mikro ukuran 200 μl ; 500 μl ; 1,5 ml – 2 ml;
- o) 1 set primer deteksi IHHNV 10 μM (Tang *et al.*, 2000):
  - 389F : 5'-CGG-AAC-ACA-ACC-CGA-CTT-TA -3'
  - 389R : 5'-GGC-CAA-GAC-CAA-AAT-ACG-AA-3'

**CATATAN 1:** Bahan disesuaikan dengan metode standar yang digunakan.

**CATATAN 2:** Pembuatan larutan diuraikan pada lampiran C

**CATATAN 3:** Bahan pewarna DNA (poin e) dapat menggunakan bahan komersial lain yang sejenis

## 7. Prosedur

### 7.1 Persiapan contoh uji

#### a) *Pooling* contoh uji

Kelompokkan contoh uji sesuai Tabel 1:

**Tabel 1 - Contoh uji berdasarkan stadia udang**

| Stadia udang         | Organ target  | Jumlah contoh uji  |
|----------------------|---|--------------------|
| Telur                | Seluruh bagian                                      | >150 Butir         |
| Larva dan pascalarva | Seluruh tubuh                                       | 50 ekor - 150 ekor |
| Tokolan              | Seluruh bagian tubuh kecuali bagian kepala          | Maksimal 5 ekor    |
| Udang dewasa         | <i>Haemolymph</i><br>kaki renang<br>dan/atau insang | 5 ekor*            |

**CATATAN** Untuk contoh uji induk diambil secara individual

#### b) Sampel/jaringan yang tidak direkomendasikan

IHHNV adalah virus sistemik, dan tidak mereplikasi dalam jaringan enterik (misalnya hepatopankreas, *midgut*, atau *caeca*)(OIE, 2015).



## 7.2 Ekstraksi DNA dengan metode *spin column*

- a) panaskan *elution buffer* pada 70 °C sebelum proses dimulai sampai akan digunakan (langkah butir t);
- b) masukkan 25 mg – 50 mg contoh uji ke dalam tabung mikro 1,5 ml;
- c) tambahkan 200 µl *tissue lysis buffer* dan 40 µl *proteinase K* dan homogenkan;
- d) inkubasi pada 55 °C selama 1 jam;
- e) tambahkan 200 µl *binding buffer* dan homogenkan;
- f) inkubasi pada 70 °C selama 10 menit;
- g) tambahkan 100 µl isopropanol dan homogenkan;
- h) buang bagian sampel yang tidak terlarut dengan mikropipet;
- i) pindahkan seluruh larutan tersebut ke dalam *filter tube* dengan *collection tube* yang telah dikombinasikan;
- j) sentrifugasi pada 8000 x g selama 1 menit;
- k) pisahkan *filter tube* dari *collection tube* dan buang larutan hasil sentrifugasi. Pasangkan kembali *filter tube* dengan *collection tube*;
- l) tambahkan 500 µl *inhibitor removal buffer* ke dalam *filter tube*;
- m) sentrifugasi pada 8 000 x g selama 1 menit;
- n) pisahkan *filter tube* dari *collection tube* dan buang larutan hasil sentrifugasi. Pasangkan kembali *filter tube* dengan *collection tube*;
- o) tambahkan 500 µl *wash buffer* ke dalam *filter tube*;
- p) ulangi langkah butir m) sampai dengan butir n);
- q) sentrifugasi kembali pada 13.000 x g selama 10 detik;
- r) buang *collection tube*;
- s) pasang *filter tube* dengan *tabung mikro* 1,5 ml steril (*nuclease-free*);
- t) tambahkan 50 µl - 100 µl *elution buffer* yang telah dipanaskan ke dalam *filter tube*;
- u) sentrifugasi pada 8000 x g selama 1 menit. Hasil sentrifugasi yang terdapat pada tabung mikro merupakan DNA murni;

**CATATAN 1** prosedur *spin column* di atas merupakan contoh ekstraksi DNA yang menggunakan kit komersial

**CATATAN 2** prosedur ekstraksi DNA disesuaikan dengan kit komersial yang digunakan

## 7.3 Pengukuran DNA

- a) Ukur konsentrasi DNA dengan alat pengukur konsentrasi DNA pada panjang gelombang 260 nm. Hitung konsentrasi DNA dengan menggunakan rumus:

$$\text{Konsentrasi DNA} = A_{260} \times 50 \times \text{faktor pengenceran}$$

Keterangan:

$A_{260}$  = Nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm

- b) lakukan pengenceran apabila konsentrasi yang diperoleh lebih tinggi dari yang diperlukan;
- c) periksa kemurnian DNA dengan menghitung perbandingan hasil pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ );
- d) simpan larutan DNA pada -20 °C apabila tidak langsung digunakan.

**CATATAN** Prosedur pengukuran DNA disesuaikan dengan alat yang digunakan



## 7.4 Amplifikasi

- siapkan DNA *template* dan bahan *mastermix*;
- buat *mastermix* amplifikasi sesuai dengan Tabel 2. Siapkan volume *mastermix* 10 % lebih banyak dari yang dibutuhkan;
- homogenkan *mastermix* dan distribusikan 23  $\mu$ l ke masing-masing tabung mikro 0,2 ml;
- tambahkan 2  $\mu$ l DNA *template* contoh uji, kontrol positif, dan kontrol negatif ke dalam *mastermix*;
- lakukan amplifikasi PCR sesuai Tabel 3.

**CATATAN** Seluruh proses preparasi reagen dan DNA dilakukan di atas es

**Tabel 2 – Komposisi koktail PCR**

| No    | Nama bahan                 | Volume / reaksi ( $\mu$ l) | Konsentrasi akhir |
|-------|----------------------------|----------------------------|-------------------|
| 1     | <i>nuclease-free water</i> | 14,875                     |                   |
| 2     | 5 x PCR Buffer             | 5                          | 1 x               |
| 3     | 25 mM MgCl <sub>2</sub>    | 1,5                        | 1,5 mM            |
| 4     | dNTP <i>mix</i>            | 0,5                        | 200 $\mu$ M       |
| 5     | Primer 389F (10 $\mu$ M)   | 0,5                        | 200 nM            |
| 6     | Primer 389R (10 $\mu$ M)   | 0,5                        | 200 nM            |
| 7     | <i>Taq</i> DNA Polymerase  | 0,125                      | 0,625 U           |
| 8     | DNA <i>template</i>        | 2                          | 10 ng – 100 ng    |
| Total |                            | 25                         |                   |

**CATATAN** Komposisi koktail disesuaikan dengan kit komersial yang digunakan

**Tabel 3 – Program amplifikasi**

| Proses          |                  | Suhu (°C) | Waktu    | Siklus |
|-----------------|------------------|-----------|----------|--------|
| Denaturasi awal |                  | 95        | 5 menit  | 1      |
| Amplifikasi     | Denaturasi       | 95        | 30 detik | 30     |
|                 | <i>Annealing</i> | 55        | 30 detik |        |
|                 | Ekstensi         | 72        | 1 menit  |        |
| Ekstensi akhir  |                  | 72        | 7 menit  | 1      |

## 7.5 Elektroforesis

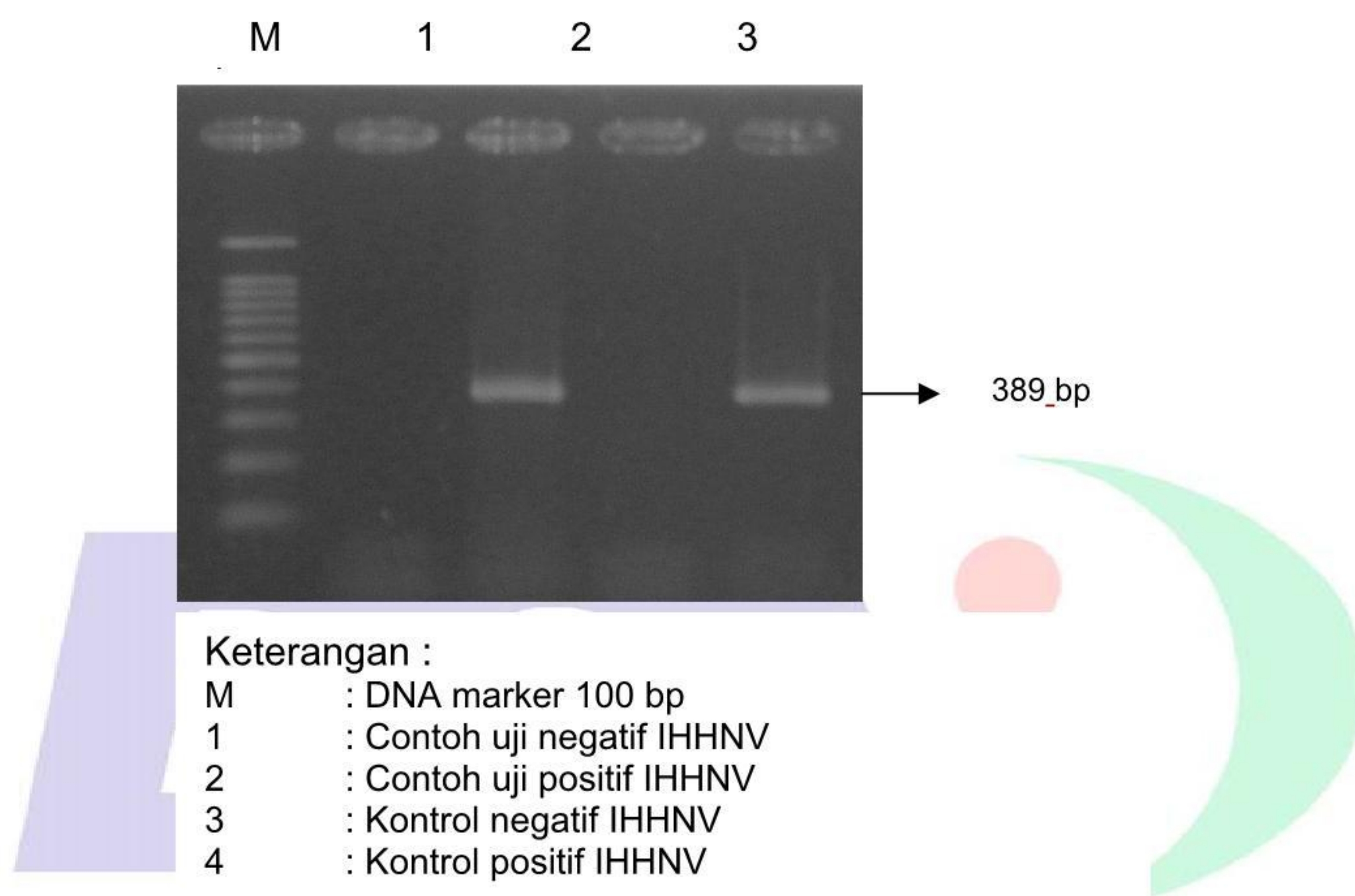
- masukkan gel agarosa 1,5 % ke dalam *chamber* elektroforesis dengan posisi sumur (*well*) pada kutub negatif;
- tambahkan larutan 0,5x TBE *buffer* hingga gel agarosa terendam;
- tambahkan 5  $\mu$ l 6x *Loading buffer* ke dalam produk PCR (contoh uji, kontrol positif dan kontrol negatif), campur dengan baik;
- ambil sebanyak 5  $\mu$ l produk PCR dan DNA *Marker*/DNA *Ladder* kemudian masukkan ke dalam lubang sumur gel agarosa;
- lakukan elektroforesis selama 30 menit dengan voltase 100 volt;
- rendam gel agarosa dalam larutan pewarna DNA selama 10 menit;
- selanjutnya gel agarosa direndam dalam akuades selama 10 menit untuk menghentikan pewarnaan;
- gel agarosa diamati di atas transiluminator UV dan dokumentasikan.



## 7.6 Interpretasi hasil

Berdasarkan pola pita pada gel agarosa setelah proses elektroforesis terhadap produk PCR yang diamati dengan transiluminator UV, maka :

- Kontrol positif (DNA IHHNV); terlihat adanya pita berukuran 389 bp;
- Kontrol negatif (blanko); tidak terlihat adanya pita berukuran 389 bp;
- Contoh uji positif IHHNV; terlihat adanya pita DNA berukuran 389 bp;
- Contoh uji negatif IHHNV; tidak terlihat adanya pita berukuran 389 bp.



**Gambar 1 – Hasil deteksi IHHNV dengan metode *single step* PCR**

## 8. Jaminan mutu

- a. hasil ekstraksi DNA mempunyai  $A_{260}/A_{280}$  berkisar antara 1,8 – 2,1;
- b. proses amplifikasi dijamin kualitasnya dengan menyertakan kontrol positif dan kontrol negatif menunjukkan hasil yang konsisten.



**Lampiran A (Normatif)**  
**Hasil alignment sekuen DNA IHHNV**  
*Accession no. AF218266*

**Sekuen DNA IHHNV untuk kontrol positif:**

CGGAACACAA  
CCCGACTTTATTGAAGGGACTCCCGACGGACCGGACGAAATGGACGGAAGGCGACTGGAAGAGAGTGAGATTG  
AAAAACAAGTGGAAAGTACAACATGGTACACCTTCGTCATCAGAGAAAAACCACAACCAAGAAGACTCTCCGG  
ACGAACGCCAAACTTCACCATTACAGATCATGGTGACCACTGGCACATCACATACTCCGGACACCCAACCAAT  
AAGACCAGACATAGAGCTACAATCCTCGCCTATTTGGGAGTTACCTTTGCTGCCAGAGCCGAAGCTGAAGCGA  
CTACGGTACTTATTAAAGATATCAAGAGATGGATACTCTATCTTATCAGATACGGTATTGAACGGCTTTCGTA  
TTTTGGTCTTGGCC

**CATATAN :** sekuen yang digarisbawahi merupakan posisi primer IHHNV





## Lampiran B (Informatif) Prosedur ekstraksi

### A.1 Metode presipitasi

- a) masukkan 25 mg – 50 mg contoh uji ke dalam tabung mikro 1,5 ml;
- b) tambahkan 1 000  $\mu$ l larutan ekstraksi DNA komersial, homogenkan menggunakan *pellet pestle*;
- c) sentrifugasi pada 10 000 x *g* selama 10 menit;
- d) pindahkan supernatan ke tabung mikro baru yang telah diisi 500  $\mu$ l etanol 96 %;
- e) kocok tabung mikro secara perlahan, diamkan selama 1 menit;
- f) sentrifugasi pada 4 000 x *g* selama 1 menit;
- g) buang cairan, cuci *pellet* dengan 1 000  $\mu$ l etanol 75 %, diamkan selama 1 menit;
- h) buang cairan, keringkan selama 15 detik;
- i) cuci kembali *pellet* dengan 1 000  $\mu$ l etanol 75 %, diamkan selama 1 menit;
- j) buang cairan, keringkan selama 15 detik;
- k) tambahkan DDW sebanyak 100  $\mu$ l - 200  $\mu$ l dan homogenkan;





## Lampiran C (Informatif) Pembuatan larutan dan media

### C.1 Larutan GelRed 3x *in water* (pewarna DNA)

Cara membuat :

- tambahkan 30  $\mu$ l stok GelRed™ (10 000x) pada 100 ml akuades kemudian aduk sampai homogen;
- tempatkan GelRed 3x *in water* pada wadah yang terbuat dari polypropylene atau plastik;
- simpan pada suhu ruang dan di tempat yang terhindar dari cahaya.

### C.2 Gel agarosa 1,5 %

Cara membuat :

- larutkan 1,5 g agarosa dalam 100 ml larutan 0,5x TBE *buffer* ;
- didihkan hingga larutan menjadi bening;
- tuang gel agarosa setelah suhunya mencapai sekitar 60 °C pada cetakan gel agarosa yang telah dipasang sisir;
- tunggu sampai gel agarosa mengeras dan siap digunakan.

### C.3 0,5x TBE *buffer*

Cara membuat:

- buat larutan stok 5x TBE *buffer* sebanyak 500 ml dengan menimbang 54 g *Tris base*, 27,5 g *Boric acid* dan 0,5 M EDTA;
- masukkan semua bahan ke dalam botol kaca tahan panas berkapasitas 1 000 ml;
- tambahkan akuades sampai dengan volume 1 000 ml;
- larutkan bahan dengan menggunakan stirer magnetik sampai tercampur rata;
- sterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada 121 °C;
- untuk membuat larutan siap pakai (larutan kerja) 0,5x TBE *buffer*, larutkan 1 bagian stok dengan 9 bagian akuades.



## Bibliografi

- [1] OIE. 2015. *Manual of diagnostic tests for aquatic animals. Chapter 2.2.2. Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis.*
- [2] Sambrook, J. & D.W. Russel. 2001. *Molecular cloning: A Laboratory Manual.* CSHL Press. New York.

